RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXV. FASC. II.-III.

Clinica delle malattie nervose e mentali della R. Università di Cagliari
diretta dal Prof. C. CENI

Sul valore del modo di precipitare della sostanza nervosa sotto forma reticolare e sulla resistenza delle neurofibrille

DEL
Dott. CARLO TODDE
AIUTO



(Con 2 Figure)

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1909.

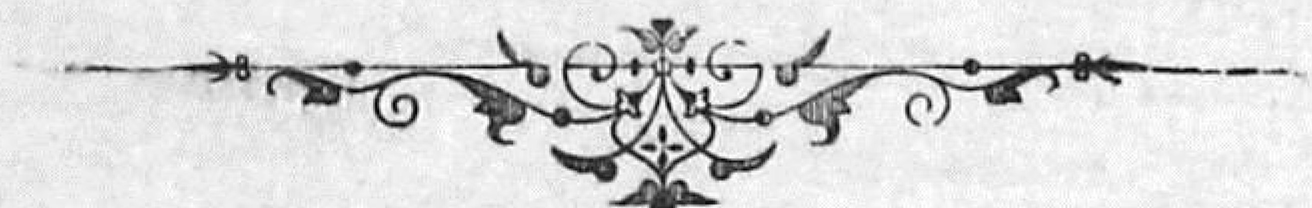
RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXV. FASC. II.-III.

Clinica delle malattie nervose e mentali della R. Università di Cagliari
diretta dal Prof. C. CENI

Sul valore del modo di precipitare della sostanza nervosa sotto forma reticolare e sulla resistenza delle neurofibrille

DEL

Dott. CARLO TODDE
AIUTO



(Con 2 Figure)

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1909.

[611.]

Le vaste ricerche di Bütschli [1], di Hardy [2], di Quinche [3], di V. Bemmelen [4] hanno illustrato una serie infinita di strutture reticolari ottenute coi metodi più svariati, di molti colloidi inorganici ed organici, nello stato di gelificazione.

Dette esperienze si riferiscono però sempre a colloidi puri.

Recentemente il Pighini [5] ha studiato la struttura di precipitazione in quei complessi miscugli di colloidi che sono i tessuti dell'organismo, con speciale obbietto al tessuto nervoso e alle reazioni fra esso e i liquidi che sono generalmente usati nei metodi istologici. Così ha studiato il modo di precipitazione della sostanza nervosa di fronte all' alcool, al sublimato, al formolo, al bicromato potassico (liq. di Müller), al nitrato d' argento, alla piridina; e, sopratutto a modo di confronto, ha ripetuto i medesimi saggi in altri tessuti quali della tiroide, del fegato, della milza, dei muscoli, del rene.

Per le sue ricerche il Pighini ha assoggettato degli estratti di sostanza nervosa, spalmati su vetrini porta-oggetti, a tutti i trattamenti cui si sottopongono i pezzi di tessuto nervoso nei metodi fibrillari di Cajal e Donaggio.

Egli crede d' aver ottenuto in tal modo dei reticoli, che sarebbero un prodotto specifico dei procedimenti tecnici adoperati (nitrato d'argento e piridina), inquantochè non si ottengono con altri procedimenti, per esempio per azione dell' alcool, del formolo, del sublimato, nè con estratti di altri organi: di fegato, di rene, di tiroide, di milza, di muscoli.

Secondo l' Autore le strutture osservate sono strutture di gelificazione di colloidi e solo la sostanza corticale ha offerto vere immagini reticolari, vale a dire reticoli intessuti di esili filamenti fibrillari, e solo quando essa venne precipitata con nitrato d' argento e con piridina.

Il Pighini non formula delle conclusioni, solo avanza un'ipotesi ed è che tali strutture reticolari siano prevalentemente date dalle sostanze contenute entro le cellule nervose ed i loro prolungamenti.

Già al lavoro del Pighini ha mosso non lieve critica il Lugaro, con una recentissima nota apparsa quest' anno e della quale dovrò occuparmi in ultimo.

Io mi sono proposto di studiare il valore dei reperti ottenuti dal Pighini cogli estratti di sostanza cerebrale e perciò ho eseguito una serie d' esperienze:

I.) Ho ripetuto le esperienze del Pighini circa al modo di precipitazione della sostanza nervosa di fronte alla piridina e all' alcool.

II.) Ho ripetuto i medesimi saggi sempre con estratti di sostanza nervosa sottoposta però prima a coagulazione rapida col calore, seguendo il concetto esposto dal Lugaro, in una recentissima nota.

III.) Ho voluto vedere gli effetti della putrefazione avanzata sul reticolo descritto dal Pighini.

IV.) Infine, come termine di confronto alle precedenti esperienze, ho voluto ripetere le ricerche del Lugaro, sottoponendo a coagulazione rapida col calore pezzi di midollo spinale di cani e poi trattandoli coi metodi Donaggio (III.) e Cajal (processo con prefissazione in alcool ammoniacale).

Primo gruppo di esperienze.

Come materiale d' esperimento mi sono servito anch' io di pezzi di cervello di pollo, adoperando scrupolosamente la tecnica descritta dal Pighini.

Quantità pesata di tessuto veniva ridotta in minuti frammenti, pestata quindi nel mortaio e diluita in quantità determinata d' acqua distillata (10:3). Passata con l' aiuto d' una spatola per un fine setaccio metallico veniva da ultimo compressa attraverso uno spesso pannolino.

Il succo così raccolto in un bicchiere, bene mescolato, veniva disteso con un agitatore di vetro in sottile strato sopra il vetrino porta-oggetti.

Questi s' immergeva tosto in un bagno di piridina e vi si lasciava tre giorni. Lavato in acqua rinnovata più volte per 6-8 ore, il preparato si passava in molibdato cloridrico (molibdato d' ammonio gr. 4, acido cloridrico goccie 2, acqua p. cento) per 6-8 ore; si lavava in acqua, si differenziava in alcool, si lavava nuovamente in acqua; nuovo bagno in molibdato per meglio fissarne il colore (per circa 30 m'); lavare e asciugare all' aria calda.

Altri preparati immersi invece in alcool comune per 12 ore. Lavai in acqua, quindi colorazione con soluzioni di bleu di metilene, di tionina; lavai ancora, differenziai in alcool; lavaggio, asciugamento all' aria calda.

Ecco quanto ho potuto osservare all' esame microscopico di questi preparati:

Piridina. Sul fondo incoloro del preparato appare una trama, una struttura reticolare in certi punti grossolana, in altri piuttosto fina.

Le maglie del reticolo sono singolari: ora piccolissime, ora grandi e di forme svariate. Si notano pure filamenti, in genere più spessi e più colorati, a direzione rettilinea.

Tanto questi, quanto quelli che prendono parte alla formazione reticolare appaiono in genere granulosi e intersecati da nuclei di neuroglia o da masse intensamente colorate.

Qnesta trama trabecolare non ha nulla a che vedere col reticolo neurofibrillare descritto dal Donaggio [7].

Alcool. Immagini microscopiche poco dissimili danno i preparati fissati in alcool e colorati con la tionina o col bleu di metilene.

La struttura è più o meno minuta, le maglie sono più o meno piccole, ma queste lievi diversità riscontrabili pure in diversi punti d' uno stesso preparato mi pare che dipendano sia dalla maggiore o minore diluizione della sostanza cerebrale, sia dalla sottigliezza dello strato che veniva disteso sul vetrino copri-oggetti.

In genere la struttura fondamentale del preparato corrisponde in tutto a quella sopra descritta.

Come si vede da quanto ho esposto, anch' io adoperando gli estratti di sostanza cerebrale di pollo fissati con la piridina ho potuto avere strutture reticolari molto simili a quelle descritte dal Pighini, inoltre mi è dato rilevare che lievissime diversità si osservano fra i preparati di sostanza cerebrale fissati con l' alcool e quelli con la piridina.

Secondo gruppo di esperienze.

I pezzi di cervello di pollo, dopo essere stati immersi per 15′ e 30′ in oltre mezzo litro di soluzione fisiologica di cloruro di sodio riscaldato a 100°, venivano asciugati bene e poi trattati con la tecnina già esposta.

Piridina. Essendo i reperti identici ne rifesco assieme.

Osservando i preparati ad immersione appare una trama trabecolare poco diversa da quella osservata nei preparati di estratti di sostanza cerebrale che non era stata sottoposta alla cottura. In alcuni punti la struttura reticolare è grossolana, a trabecole ispessite, maggiormente colorate, in altre invece, specie ai margini del preparato ove la sostanza cerebrale è distesa in uno strato più sottile, appare fine e minuta in modo da rassomigliare ad una rete.

La formazione reticolare si è avuta adunque nonostante ch' io abbia fatto agire l' azione coagulante del calore sulla sostanza cerebrale prima dell' azione precipitante del fissatore piridina.

Già il risultato di questa esperienza porterebbe a mettere in dubbio un' analogia genetica fra i precipitati degli estratti di sostanza cerebrale e le neurofibrille, giacchè nessuno può negare il fatto che possa precipitare ciò che è già precipitato. Si potrebbe però obbiettare che data la complessità dei colloidi che formano i protoplasmi viventi certi colloidi precipiterebbero col calore, mentre altri solo coi fissatori, ma a me pare che con questa ipotesi difficilmente si spiegherebbero le quasi costanti immagini microscopiche che ci danno i preparati di estratti di sostanza cerebrale bollita e normale fissata con l' alcool o con la piridina.

TERZO GRUPPO DI ESPERIENZE.

Si sa dai lavori specialmente dello Scarpini [8], del Mattei [9] e del Martinotti circa la resistenza del reticolo fibrillare alle modificazioni cadaveriche della cellula nervosa, che in un periodo inoltrato del processo putrefattivo (verso il 6.° 7.° giorno) il reticolo endocellulare è scomparso.

Sono stati messi ora a putrefare emisferi cerebrali di pollo per 8 giorni in istufa alla temperatura di 37 $^1/_2$ e poi assoggettati gli estratti al procedimento tecnico del metodo istologico del Donaggio.

I preparati esaminati a piccolo ingrandimento ed a immersione mostrano una struttura alveolare più o meno delicata, a maglie più o meno larghe, allungate, ora più colorate, ora meno, ma sempre granulose.

L' esame microscopico dei preparati ha fatto rilevare adunque che la trama trabecolare del Pighini non è per nulla alterata, nè dissimile da quella che offrono i preparati normali.

Ripeto, a me ha fatto l'impressione che la finezza del reticolo dipenda dal grado di diluizione della sostanza cerebrale e dalla sottigliezza dello strato disteso sul vetrino.

QUARTO GRUPPO DI ESPERIENZE.

Il Lugaro [10] recentemente, immergendo pezzi di midollo di coniglio per 5′ in una massa d' acqua di soluzione fisiologica riscaldata a 55°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100 e trattandoli poi coi metodi per la dimostrazione

delle fibrille (Cajal, Donaggio, Bethe, Lugaro) ha voluto studiare il comportamento delle neurofibrille nei pezzi coagulati.

L'esame di questi pezzi non è stato ancora compiuto che ai termini estremi della serie e solo per alcuni metodi. Ad ogni modo l'A. ha potuto vedere che lo stesso materiale può dare con un metodo delle immagini fibrillari e non darne più con un altro: così i preparati al fluoruro d'argento dimostrarono nitidissimi reticoli neurofibrillari in diversi tipi cellulari. Egli dice che dalle sue ricerche ha la conferma del valore nullo dei reperti negativi e d' altra parte è portato a ritenere che il reperto positivo avuto, sebbene parziale, sia una prova indiscutibile dell'esistenza delle neurofibrille nel vivente. « Esse, conclude, sono un'organo cellulare, ed è lecito per conseguenza formulare delle ipotesi circa la loro funzione ».

Io ho ripetuto le esperienze del Lugaro, spingendomi oltre però nella cottura dei pezzi.

Le mie esperienze sono state fatte su quattro giovani cani che venivano uccisi per rapido dissanguamento. Tosto si asportava l' intiero midollo, che spogliato della dura madre e tagliato a pezzi venivano questi immersi nella soluzione fisiologica di cloruro di sodio bollente e lasciati nel liquido continuamente agitato parte per 5′, parte per 10′, parte per 15′ e parte per 30′. I pezzi tolti e asciugati venivano trattati coi metodi di Cajal (processo con prefissazione in alcool ammoniacale) e di Donaggio (III. metodo). Naturalmente si fissarono pure dei pezzi di confronto normali.

L' esame istologico ha messo in evidenza i seguenti fatti:

Pezzi sottoposti alla bollitura per 5′ metodo III. Donaggio. In genere le cellule hanno forma e contorni regolari, non esiste alcuna traccia di reticolo, e al suo posto è una sostanza disgregata, finemente granulare e talvolta pallidamente colorata; altre volte la cellula ha un aspetto spongioso, come di trabecole più o meno fitte, più o meno colorate col contorno del nucleo e coi margini periferici del corpo cellulare più intensamente colorati. Il nucleolo in questi elementi è colorato mentre il nucleo è invaso da sostanza disgregata o da fini granulazioni.

Non mancano cellule in cui non c' è traccia di prolungamenti e sono queste ridotte ad una massa uniforme colorata. I prolungamenti, dove esistono, o presentano l' aspetto granuloso del corpo cellulare, o sono intensamente e omogeneamente colorati, o presentano fini fibrille che si arrestano in genere appena entrano nel corpo cellulare e solo qnalche volta si continuano in parte lungo la periferia. Ho potuto vedere inoltre in qualche elemento che le fibrille dei prolungamenti si spezzettano man mano che si avvicinano al corpo cellulare dove finiscono in minute granulazioni. Qualche rara cellula però mostra un fine reticolo che, per la sua discontinuità, è difficile poter seguire in tutta l' estensione della cellula stessa.

Poco diversi sono i risultati ottenuti nei pezzi sottoposti alla bollitura per 10′, 15′ e 30′.

Vi sono cellule in cui la forma ed i contorni sono poco definiti con scomparsa totale dei prolungamenti. In genere si hanno le stesse immagini microscopiche. Non mancano però elementi, in qualche preparato nnmerosi, in cui i prolungamenti mostrano fibrille normali e alterate nel modo sopra descritto e così è possibile trovare qualche rarissima e grossa cellula delle corna anteriori che offre traccia di fine reticolo endocellulare debolmente colorato.

Esame istologico dei pezzi sottoposti alla bollitura per 5′ metodo Cajal.

La forma ed i contorni cellulari sono poco alterati.

Numerose cellule si presentano nel loro corpo e nei loro prolungamenti scolorate e ripiene di una sostanza granulosa giallo-pallido. Altre volte il corpo cellulare a fondo giallastro e cosparso di minuti granuli nerastri che diventano più numerosi attorno al nucleo. In un discreto numero di elementi si osservano nei prolungamenti filamenti fibrillari che però in genere, come nei preparati colorati col metodo Donaggio, si arrestano non appena entrano nel corpo cellulare o meno spesso proseguono lungo la periferia del corpo cellulare.

Più facilmente con questo metodo si può seguire il modo con cui si comportano in molti elementi le fibrille dei prolungamenti entrando nel corpo cellulare. Infatti le fibrille dei prolungamenti, che sono abbastanza normali nella parte più distale, man mano che vanno approssimandosi dapprima perdono la loro continuità, poi si spezzettano e terminano nel corpo cellulare frammentate in granuli che si diffondono nel corpo cellulare stesso (V. *fig. 1.*).

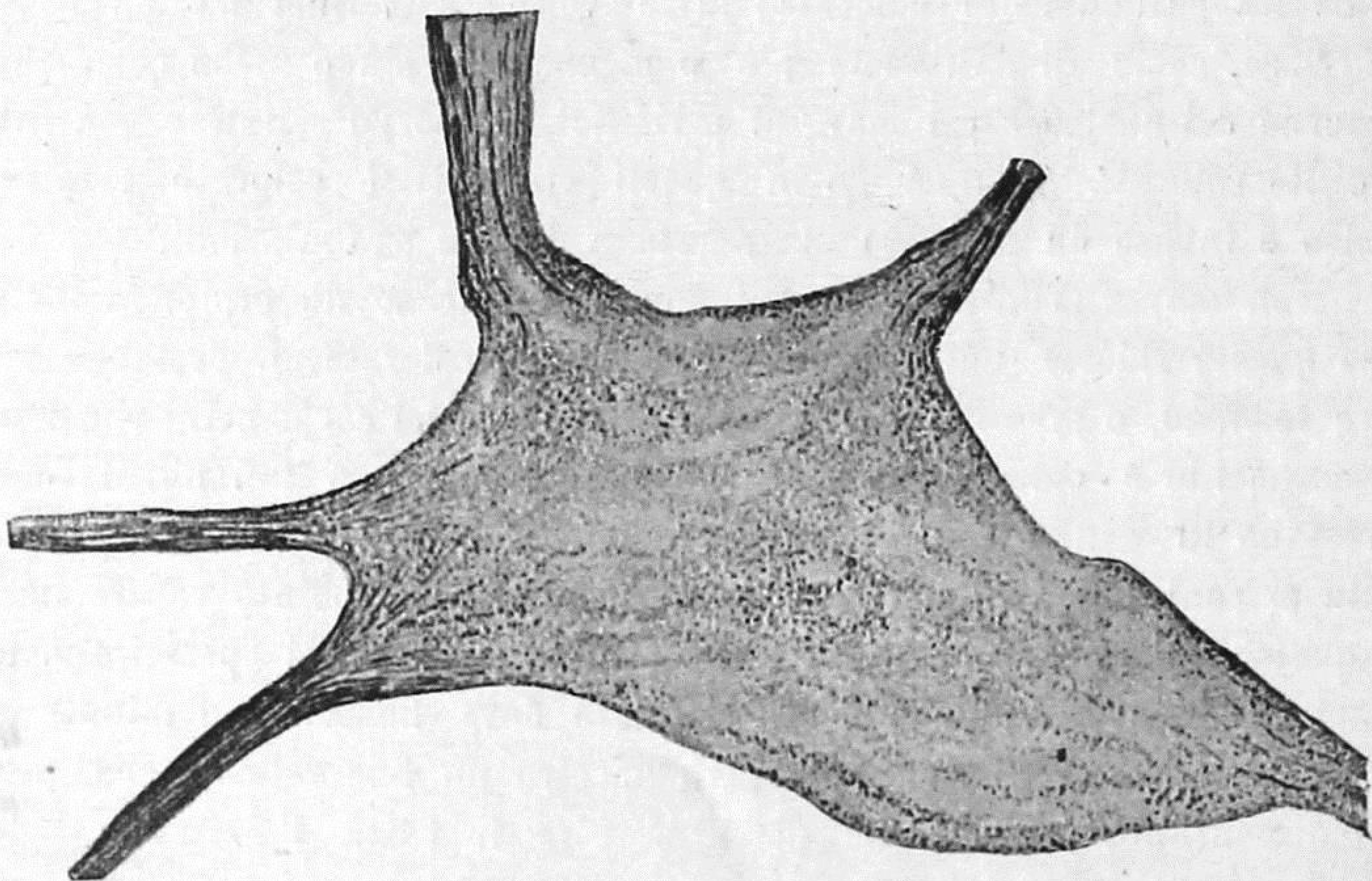


Fig. 1. Cellula corna anter. mid. spin. cane bollitura per 5'. Metodo Cajal. Spezzettamento, frammentazione delle fibrille lunghe nel prolungamento, disfacimento granulare delle maglie del reticolo.
OC. 4. comp. Obb. $^1/_{15}$ semi-apoc. imm. omog. (K).

Altri elementi in genere piccoli e situati nelle corna anteriori presentano dei reticoli fibrillari più o meno alterati; non manca però qnalche rara cellula in cui si dimostra un reticolo neurofibrillare abbastanza nitido e talora completo.

L' esame istologico dei pezzi sottoposti alla bollittura per 10′ e 15′ ha condotto a risultati molto simili tra loro e poco diversi dai precedenti.

Per evitare inutili ripetizioni dirò che anche in questi ho potuto osservare immagini microscopiche identiche: aspetto finemente granuloso delle cellule, aspetto trabecolare, spugnoso con granuli minuti nerastri.

Le fibrille dei prolungamenti alterandosi assumono più frequentemente l' aspetto sopra descritto; non mancano fini fibrille normali. Così pure in qualche raro elemento la struttura reticolare endocellulare è conservata in modo da dare alla cellula un aspetto normale.

Inoltre ho potuto vedere delle cellule in cui il solo prolungamento era intensamente colorato in nero, altri elementi invece mostravano dei blocchi neri o attorno al nucleo o in una parte del corpo cellulare.

Esame istologico dei pezzi sottoposti alla bollittura per 30′.

Si osserva in un maggior numero di cellule il fenomeno della distruzione delle neurofibrille. Questa dissoluzione si nota non solo nel corpo cellulare, ma anche in tutto il decorso dei prolungamenti. Tra i prolungamenti però di solito ne esiste uno più sottile che parte direttamente dal corpo cellulare e che ha tutte le parvenze del prolungamento nervoso. In questo la distruzione è non solo meno accentuata, ma si osservano fibrille normali, quasi mostrando una maggiore resistenza.

I granuli nei prolungamenti hanno una disposizione lineare in modo da conservare a piccolo ingrandimento l' aspetto delle neuro-fibrille. Nel corpo cellulare, poi, questi granuli, che rappresentano evidentemente il residuo del reticolo, si dispongono in alcuni elementi a trabecole, assumendo il corpo dell' elemento cellulare un aspetto tigrato, aspetto che può ricordare il fenomeno della vacuolizzazione. I vacuoli sono piccoli e numerosi (circa 50-60 per cellula). Questa forma trabecolare si diffonde anche a tutti i prolungamenti protoplasmatici e manca invece in quelli esili che, come sopra abbiam detto, l' aspetto fà ritenere siano prolungamenti nervosi.

Non mancano in ultimo cellule, sebbene rare, in cui l' elemento neurofibrillare nel corpo e nei prolungamenti si presenta ancora ben

conservato nella sua nitidezza, nella sua continuità (V. *fig. 2.*). Questi elementi sono di media grandezza e si osservano nelle corna anteriori.

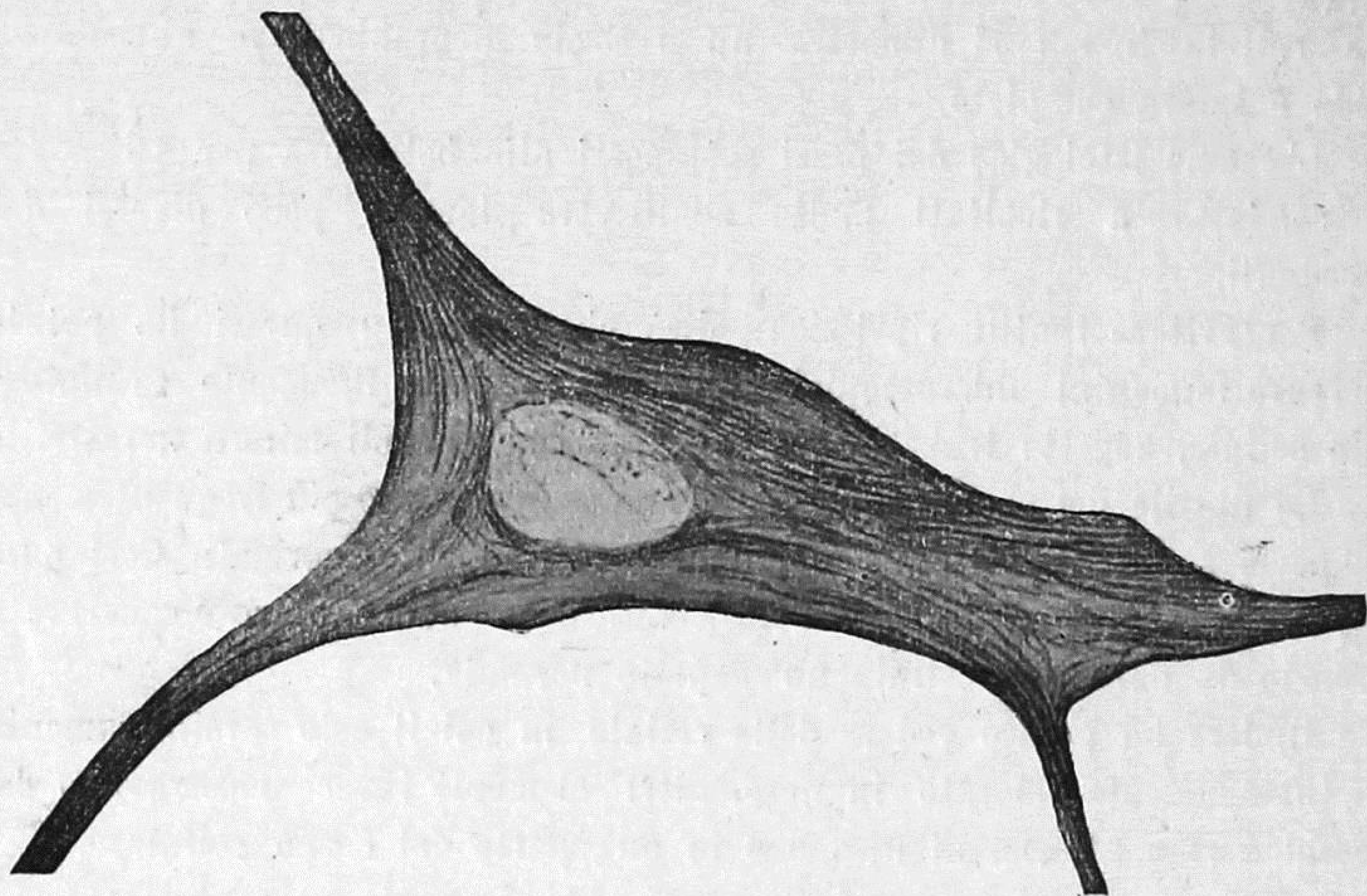


Fig. 2. Cellula corna anter. mid. spin. cane bollitura per 30'. Metodo Cajal. Apparato neurofibrillare normale.
OC. 4 comp. Obb. $^1/_{15}$ semi-apoc. imm. omog. (K).

Da quanto ho esposto si vede che differenze essenziali non esistono fra i reperti delle varie esperienze e fra quanto ha potuto dare l'esame istologico dei pezzi trattati col metodo Donaggio e di quelli trattati col metodo Cajal.

In genere nelle cellule non esiste alcuna traccia di reticolo e al suo posto è un fatto frequente ritrovare una sostanza disgregata finemente granulare o in frammenti a disposizione lineare. Adoperando il metodo Donaggio sono rari gli elementi cellulari che presentano la struttura reticolare solo qua e là ancora visibile e sono rarissimi (in una serie di preparati ne ho potuto notare uno o due) quelli che mostrano immagini fibrillari abbastanza normali anche nei pezzi sottoposti all'ebollizione per 10′, 15′ e 30′. Col metodo Cajal poi ci è dato osservare anche nei pezzi bolliti per $^1/_2$ ora rari elementi cellulari in cui l'apparato reticolare è nitidissimo, in tutto eguale a quello dei pezzi normali.

Un fatto che ho potuto notare con una certa costanza in molti preparati, è la persistenza delle fibrille lunghe specie nei prolungamenti anche quando questi si sono osservati staccati dal

corpo cellulare. Ciò dimostrerebbe, a me pare, una maggiore resistenza delle fibrille lunghe, specie lungo i prolungamenti, di fronte al reticolo fibrillare endocellulare.

Un altro fatto degno di rilievo e che appare tanto con un metodo che con l' altro, sebbene col metodo Cajal sia più frequente ed anche più evidente, è il modo con cui si comportano le fibrille lunghe entrando nel corpo cellulare.

Risulta evidente che il disfacimento granulare delle maglie del reticolo, la frammentazione, lo spezzettamento delle fibrille lunghe stanno a indicare a quali modificazioni vanno incontro le neurofibrille per azione del calore ed in qual modo venga ad alterarsi e scomparire dapprima il reticolo endocellulare certamente meno resistente e poi le fibrille lunghe.

Non sembra in ultimo privo d' interesse ricordare un fenomeno che si è potuto notare col metodo Cajal nei pezzi sottoposti alla bollitura per 30′ ed è la maggior resistenza in genere delle fibrille lunghe nel prolungamento che per la sua sottigliezza o per il modo di comportarsi pare possa essere ritenuto come nervoso.

Circa al contegno dei diversi tipi cellulari debbo dire che le cellule presentanti tracce di reticolo o reticolo completo erano localizzate nelle corna anteriori e sopratutto grandi nei preparati alla tionina, in genere di media grandezza e piccole nei preparati al nitrato d' argento.

Queste esperienze se da una parte dimostrano ancora una volta come ben altro sieno le strutture di precipitazione avute cogli estratti di sostanza cerebrale e i reticoli del Donaggio e del Cajal, dall' altra mi pare mostrino:

In primo luogo quali alterazioni offrono le neurofibrille nei pezzi sottoposti alla bollitura protratta.

Secondariamente la diversa resistenza che presenta l' apparato reticolare nelle varie parti dell' elemento cellulare di fronte all' azione del calore.

Infine come si riesca a colorare le neurofibrille d'alcuni rari elementi anche nei pezzi cotti per 30 m′. Ciò è in parte una conferma a quanto tende a ritenere il Lugaro coi primi risultati avuti adoperando il metodo al fluoruro d' argento.

I miei preparati però danno pure la spiegazione del reperto negativo osservato nella maggior parte degli elementi da Lugaro,

Riassumendo quindi i fatti principali dei risultati delle mie ricerche mi pare di poter dire:

1). Le strutture di gelificazione di colloidi che ottiene il Pighini non sono reazioni elettive ai due reagenti, piridina e nitrato d'argento, ma si hanno anche col fissante alcool.

2). Questa formazione reticolare si ha anche quando si faccia agire l'azione coagulante del calore sulla sostanza cerebrale prima dell'azione precipitante dei fissatori.

3). Lo stesso fenomeno di precipitazione si osserva anche quando si sottoponga prima la sostanza cerebrale ad una putrefazione avanzata.

4). L'apparato reticolare di fronte all'azione del calore si comporta in due modi:

In alcune cellule, e sono la maggior parte, va incontro ad un processo di distruzione progressiva, dimostrabile anche nei pezzi sottoposti all'ebollizione tanto col metodo Donaggio che col Cajal.

In altre cellule, rarissime, le neurofibrille presentano una resistenza notevolissima, conservando queste, specialmente col metodo Cajal, un aspetto del tutto normale anche nei pezzi sottoposti alla bollitura per 30'.

BIBLIOGRAFIA.

1. O. Bütschli. Untersuchungen über Structuren. pag. 82. Tav. VII. Lipsia 1898.
2. W. B. Hardy. On the mechanism of gelation in riversible colloidal systems. *Proceed. of the Roy. Soc.* Vol. LXVI· pag. 95. 1900.
3. Quinche. *Ann. der Physik*, B. 7. 9, 10, 11, 13. 1902-1904.
4. M. von Bemmelen. *Zeitsch. f. anorg. Chemie.* 1896-1898.
5, G. Pighini. Sopra una speciale forma reticolare di precipitazione della sostanza nervosa e sulle strutture di precipitazione di vari tessuti organici. *Rivista sper. di Freniatria.* Vol. XXXIV. Fasc. I-II. 1908.
6. E. Lugaro. Una prova dell'esistenza delle neurofibrille nel vivente. *Rivista di Patolog. nervosa e mentale.* Fasc. I. 1909.
7, A. Donaggio. Il reticolo fibrillare endocellulare e il cilindrasse della cellula nervosa dei vertebrati e vari metodi di colorazione elettiva. *Rivista sper. di Freniatria.* Vol. XXX. Fasc. 2-3. 1904.
8. V. Scarpini Le alterazioni cadaveriche delle cellule nervose trattate col metodo Donaggio. *Rivista sper. di Fren.* Vol. XXXI. F. 3-4. 1905.
9. Di Mattei. Sulle alterazioni cadaveriche del reticolo fibrillare endocellulare e delle fibrille lunghe nelle cellule del midollo spinale. *Rivista sperim. di Freniatria.* Vol. XXX. Fasc. I.-II. 1907.
10. Lugaro. Op. cit.
11. Id. I problemi odierni della psichiatria. p. 109-110. Remo Sandron. Palermo 1907.

Bottazzi F. Principi di Fisiologia. Vol. I. Chimica Fisica. Società Editr. Libraria. Milano 1906.
